

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4113494号
(P4113494)

(45) 発行日 平成20年7月9日(2008.7.9)

(24) 登録日 平成20年4月18日(2008.4.18)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 27/447 (2006.01)
 GO 1 N 27/26 3 1 5 D
 GO 1 N 27/26 3 1 5 H
 GO 1 N 27/26 3 1 5 Z

請求項の数 13 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2003-504084 (P2003-504084)	(73) 特許権者	500360460
(86) (22) 出願日	平成14年6月7日(2002.6.7)		セントロ ナショナル デ インベスチガ
(65) 公表番号	特表2004-529368 (P2004-529368A)		シオネス シエンテイフィカス
(43) 公表日	平成16年9月24日(2004.9.24)		キューバ国、シウダド デ ラ ハバナ、
(86) 国際出願番号	PCT/CU2002/000004		ブラヤ、 キュバナカン、アベニダ 25
(87) 国際公開番号	W02002/101374		ナンバー 15202 エスク. ア 1
(87) 国際公開日	平成14年12月19日(2002.12.19)		58
審査請求日	平成17年2月1日(2005.2.1)	(74) 代理人	100066692
(31) 優先権主張番号	2001-0133		弁理士 浅村 皓
(32) 優先日	平成13年6月8日(2001.6.8)	(74) 代理人	100072040
(33) 優先権主張国	キューバ(CU)		弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100094673
			弁理士 林 拓三
		(74) 代理人	100118821
			弁理士 祖父江 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パルス電界ゲル電気泳動のCHEF装置室の電極内の電圧をクランプする回路

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

パルス電界ゲル電気泳動の外形クランプ均一電界装置室の電極における電圧をクランプして、強さは同じであるが異なるA及びBの方向の2つの均一電界を独立して発生する回路であって、該回路は正出力と負出力とを有する電源と、2つの正出力と2つの負出力とを持つ電界切換え用の別の回路と、緩衝液で満たされた電気泳動室であって1つの正多角形のm個の辺上に設置された各辺当りk個の電極を有する電極配列を持つ電気泳動室とを有し、

ここでL₁辺はA又はBの方向に直角な方向に一致し、L_{m/2+1}辺が該L₁辺に平行となり、C辺およびD辺と呼ぶ他の辺がL₁辺およびL_{m/2+1}辺のそれぞれ左側と右側とに位置し、E_{iC}-E_{iD}電極が多角形の各側に等しい間隔で設置され、したがって、nがk・(m-2)/2に等しく、かつ、iが1とnの間の自然数であるとき、L₁辺から同じ距離にある電極で形成されるn個の(E_{iC}-E_{iD})電極対P_iが存在し、

前記A又はBの方向の均一電界を独立して発生する回路において、

・ 前記電源からの正出力が、1つのダイオード及びそのダイオードに並列に接続されたk個のダイオードの各々を介して、L_{m/2+1}辺のk個の電極の各々に接続され、また

・ 前記電源からの負出力が、1つのダイオード及びそのダイオードに並列に接続されたk個のダイオードの各々を介して、L₁辺のk個の電極の各々に接続され、

・ C辺及びD辺のE_{iC}-E_{iD}電極は、2つの相対するダイオードを介してお互い

に接続されると共に、かつそのダイオードの相互の接続点には、前記電源の電圧を $L_{m/2+1}$ 辺から該 L_1 辺に向かって階段状に電圧降下すべく n で分割しかつ各電極に加えられる電圧の誤差を補償した電圧を印加する、

異なる A 及び B の方向の 2 つの均一電界を独立して発生する回路。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の回路であって、同時には一方の均一電界のみが発生する前記回路。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の回路であって、 L_1 辺上に位置する各電極はダイオードのアノードに接続され、これらダイオードのカソード同士は結合されて前記 1 つのダイオードのアノードに接続され、前記 1 つのダイオードのカソードは電源の負出力に接続される前記回路。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の回路であって、 $L_{m/2+1}$ 辺上に位置する各電極はダイオードのカソードに接続され、これらダイオードのアノード同士は結合されて前記 1 つのダイオードのカソードに接続され、前記 1 つのダイオードのアノードは電源の正出力に接続される前記回路。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の回路であって、前記電源の電圧を $L_{m/2+1}$ 辺から該 L_1 辺に向かって階段状に電圧降下するために複数の抵抗および複数のダイオードが用いられ、 n が $k \cdot (m - 2) / 2$ に等しい場合に電源の正出力および負出力両端に接続された $n + 1$ 個の抵抗および 10 個までのダイオードで作られた電圧分割器を形成する前記回路。

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の回路であって、前記電源の電圧を $L_{m/2+1}$ 辺から該 L_1 辺に向かって階段状に電圧降下するために P_i 電極ごとに単一のトランジスタが用いられ、前記単一のトランジスタはエミッタ・フォロア構成であり、そのベースは電圧基準の複数ノードの 1 つに接続され、そのエミッタは前記 2 つの相対するダイオードに接続され、 i が 1 と $n/2$ の間の自然数のときは PNP 型である該トランジスタのコレクタが電源の負出力に接続され、 i が $[(n/2) + 1]$ と n の間の自然数のときは NPN 型である該トランジスタのコレクタが電源の正出力に接続される前記回路。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の回路であって、 i が 1 と $n/2$ の間の自然数のとき、前記 2 つの相対するダイオードは、カソードが対応するトランジスタのエミッタに接続され、アノードが対応する 2 つの電極に接続される前記回路。

30

【請求項 8】

請求項 6 に記載の回路であって、 i が $[(n/2) + 1]$ と n の間の自然数のとき、前記 2 つの相対するダイオードは、アノードが対応するトランジスタのエミッタに接続され、カソードが対応する 2 つの電極に接続される前記回路。

【請求項 9】

請求項 5 に記載の回路であって、前記電圧分割器の前記ダイオードは、電極に加えられた電圧における誤差を補償するために用いられる前記回路。

【請求項 10】

請求項 3 に記載の回路であって、電極に加えられた電圧における誤差を補償するために、前記 L_1 辺の電極に接続された複数ダイオードのカソード間に接続された前記 1 つのダイオードは電源の負出力に接続される前記回路。

40

【請求項 11】

請求項 4 に記載の回路であって、電極に加えられた電圧における誤差を補償するために、前記 $L_{m/2+1}$ 辺の電極に接続された複数ダイオードのアノード間に接続された前記 1 つのダイオードは電源の正出力に接続される前記回路。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の回路であって、前記 2 つの方向の均一電界を独立して発生するために、前記 2 つの方向の均一電界に共通して用いられる 1 つの電極に、各方向の均一電界ごと

50

に異なる前記 2 つの相対するダイオードの一方が接続されている前記回路。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の回路であって、正多角形の m 個の辺上に各辺当り k 個の電極が設置された電極配列を有し、 m は 4 と 50 の間の偶数自然数であり、 k は 1 と 10 の間の自然数である前記回路。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は電気泳動に用いられる電気設備に関するものであって、特に、与える方向が交番する均一電界を生成するための外形クランプ電位の生成に関する。

10

【背景技術】

【0002】

電気泳動

電気泳動は電界内の差動移行により分子を分離する技術である。分子をゲル内に置き、電界を与えて強制的に移行させると分離することができる。負に帯電した分子は陽極に向かって移行し、正に帯電した分子は陰極に向かって移行する。これにより、分子は大きさに従ってゲル内で帯状に分離する。電界を生成するには、普通、直流電源に接続した 2 枚の並列電極を設ける。

【0003】

DNA 分子は中性またはアルカリ性の緩衝剤に溶解させると負に帯電する。電界を与えると DNA 分子は細長くなり、その電荷 / 質量比は分子の大きさに無関係になる。かかる理由から、また DNA 分子は蛇に似た動きでゲルの細孔を通して移行する（すなわち、爬行する）ので、20000 塩基対より大きな分子は、分子ふるいにかけても、一定電界で電気泳動により分離することはできないとされている。

20

【0004】

パルス電界ゲル電気泳動

パルス電界ゲル電気泳動 (PFGE) は 1984 年に Schwartz と Cantor により考案され (Cell, 37, pp 67-75, 1984; 米国特許第 4, 473, 452 号、1984 年 9 月 25 日)、電気泳動により分離することが可能な DNA 分子の範囲が広がった。筆者はゲルの分離に関して、選択された幅の電気パルスを与え、与える方向を周期的に交番させることにより、20000 塩基対より大きな未処理の DNA 分子をアガロース・ゲル内で帯パターンに分離させることができた。電界を与える方向を変えることにより DNA 分子の移行の向きは変わるが、この向きを変える継続時間は分子の大きさに依存する。この帯パターンは「電気泳動パターン」、「分子カリオタイプ」、「電気泳動カリオタイプ」などと呼ばれている。

30

【0005】

全てのパルス電界ゲル電気泳動装置は次のものを含む。

1. 付属品を含む電気泳動室、
2. 所望の強さとパルス幅で電界を交番させる適当な電子回路、
3. 電極に極性を与える方法。

40

【0006】

例えば、Schwartz と Cantor が記述した装置 (Cell, 37, pp 67-75, 1984; 米国特許第 4, 473, 452 号、1984 年 9 月 25 日) や、Carle と Olson が記述した装置 (Carle G.F., Olson M.V. Nucleic. Acid Res., 12, pp 5647-5664, 1984) などの初期の PFGE 装置ではゲル内の電界の強さが均一でないので、このゲル内の DNA 分子の軌道と移行速度はゲル内における位置に依存する。

【0007】

PFGE 内の均一電界の生成

理論的には、或る間隔離して並列に置いた 2 枚の無限電極は均一電界を生成する。しかし、かかる電気泳動室の設計は実際的でない。有限電極を用いて分離ゲルで均一の強さの

50

電界を得る方法が、Chuにより次のように提案されている (Chu G., Vollrath D., Davis R.W. Science, 234, pp 1582-1985, 1986)。

【 0 0 0 8 】

1. 閉じた外形として正多角形 (正方形、長方形、6 辺形) を選択し、その辺上に電極の配列を置いて多角形の内部に均一の強さの電界を生成する。
2. 正多角形の一辺を仮想デカルト平面の X 軸 ($y = 0$) と一致させる。
3. $y = 0$ に置いた電極に 0 ボルトの電位を与える。
4. X 軸から $y = A$ の距離にある、正多角形の対向辺に置いた電極に V_0 ボルトの電位を与える。
5. 正多角形の他の辺上に X 軸から y_i の距離に置いた残りの電極に電位 $V_{(y_i)}$ を与える。ただし、 $V_{(y_i)} = V_0 * y_i / A$
6. これにより、正多角形内に生成される電位は、互いに距離 A だけ離れた 2 個の無限で並列の電極が生成する電位と同じである。
7. 2 対の対向辺に置いた電極の極性を電氣的に交換すると、合成電界の力線の間に或る角度が形成される。この角度を P F G E 「向き変え角」と呼ぶ。
8. 2 つの異なる辺の対の電極の間の極性を電氣的に交換して得られる向き変え角は、4 角形では 90° 、6 辺形では 60° または 120° である。

10

【 0 0 0 9 】

現在の P F G E 装置では 6 辺形配列の電極構成が用いられている。この装置を外形クランプ均一電界 (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) すなわち C H E F と呼び、1986 年に Chu により導入された (Chu G. Science 234, pp 1582-1585, December 16th, 1986)。

20

現在の C H E F 装置の欠点の 1 つは、閉じた外形の電極が前に述べた正多角形に限定されることである。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

C H E F 装置の電極内の電圧をクランプしてゲル内に均一の強さの電界を得る方法

これまで主として 3 つの方法が提案されているが、複雑で電子構成要素が多い。

1. 簡単な電圧分割器 (Chu G., Vollrath D., Davis R.W. Science, 234, pp 1582-1585, 1986)。
2. プッシュプル構成内のトランジスタ対に関連する電圧分割器 (Maule J., Green D. K. Anal. Biochem. 191, pp 390-395, 1990)。
3. C H E F 装置の各電極に与える電圧の制御を改善するための演算増幅器の使用 (Clark S.M., Lai E., Birren B.W., Hood L. Science 241, pp 1203-1205, 1988)。

30

【 0 0 1 1 】

P F G E 装置内の簡単な電圧分割器

C H E F 電極内の電位をクランプする方法の 1 つは直列に接続する抵抗器のネットワークを用いることである。このネットワークはゼロと V_0 の間の電圧分割器を形成する。電圧分割器の 2 個の直列抵抗器の間の結合点をノードと呼び、各ノードに 6 辺形の 1 個の電極を接続する。

40

【 0 0 1 2 】

$y = 0$ と $y = A$ (すなわち、6 辺形の 2 つの対向辺) に置いた電極を電位 0 と V_0 とにそれぞれ接続する。他に 2 つの電極グループがあり、6 辺形の 2 つの連続する辺の電極が各グループを形成する。これらの各電極は、この電極に与える電位を定義する電圧分割器のノードにそれぞれ接続する。与える電位は前のパラグラフで述べたようにして計算する。このため、6 辺形の 2 つの異なる辺上にあるが低い方の電位の電極 ($y = 0$) から同じ距離 y_i にある 2 個の電極は同じ電圧値 $V_{(y_i)} = V_0 * y_i / A$ を持たなければならない。

【 0 0 1 3 】

50

電界を与える方向を変えるため（これはP F G Eで絶対必要である）、他の2つの異なる電極グループに電位差を与える。このためにはリレーとダイオードとを用いて、ゼロボルトと V_0 ボルトの極性を与えるべき電極を、電界切替え装置を介して電源の出力に接続する。

【0014】

しかし、一連の抵抗器を用いて電圧をクランプするのは不便である。抵抗器のネットワークと緩衝剤とが接触すると、後者はネットワークの抵抗器に並列に接続する新たな抵抗器として作用する。抵抗器から電極へまたその逆に流れる電流は各電極の電位を変えて電界の均一性に影響を与える。電圧の変化は緩衝液に流入または流出する電流の量に依存し、電流量は緩衝液の濃度、温度、量、pHにとりわけ依存する。この変化は緩衝剤の導電率に、したがって純粋の抵抗回路と交換する電流の大きさに、無作為に影響を与える（Maule J., Green D.K. Anal. Biochem. 191, pp 390-395, 1990）。電圧パターンのかかる無作為の変化は制御不可能なので、各実験で得られる電気泳動パターンの結果と再現性に別の形の影響を与える。

10

【0015】

一連の抵抗器を流れる電流が緩衝剤で循環する電流よりはるかに大きい場合はかかる変化は減少する（Maule J., Green D.K. Anal. Biochem. 191, pp 390-395, 1990）。しかし、この解決策は電力が不必要に浪費されるので、より高価な高電力の構成要素（特に抵抗器）を用いざるを得ないという欠点を有する。

20

【0016】

プッシュプル構成内のトランジスタ対に関連する電圧分割器

抵抗器を用いた電圧分割器について上に説明した問題を解決するため、半導体構成要素で製作した電流源を用いることが提案された（Maule J., Green D.K. Anal. Biochem. 191, pp 390-395, 1990）。かかる電流源は、分割器の一連の抵抗器の対応するノードと各電極とを分離する。各ノードとその対応する電極との間に「プッシュプル」と呼ぶ構成の1対のトランジスタを置く。これは各電極に電流を流入させまた流出させて、緩衝液の導電率の変化に影響されずに分割器のノードの電圧を電極内で再現する。この装置は、P F G Eで電界を与える2つの方向に該当する極性を電極に与えることはできるが、いくつかの限界を有する。

30

【0017】

1. 同じ電圧値 $V_{(y_i)} = V_0 * y_i / A$ で極性を与えるべき電極の対は異なるノードから電位を得るので、全ての必要な電極対の電圧が必ずしも等しくならない。

2. 高い方の電位の電極に近い電極は、接続するプッシュプルのNPN型トランジスタから電流を受ける。他方で、低い方の電位の電極に近い電極は、接続するプッシュプルのPNP型トランジスタに電流を与える。異なる極性のトランジスタが同時に活動化するので電圧のパターンに誤差を生じる。

3. 電界を与える2つの方向の中の1つの方向の電位パターンを決める抵抗器と、他の方向の電位パターンを決める抵抗器とは同じである。そのため、各電界で電位パターンを独立に調整することができない。2つの方向の一方になんらかの変化を与えようとすると、他の方向にも必ず影響を与える。

40

【0018】

4. この回路はプッシュプル構成内に、CHEF室の電極と同じ数のトランジスタ対を有する。プッシュプル構成内のトランジスタ対は並列に接続する。トランジスタが壊れると、壊れた対がどれかを決定するのは困難である。

5. プッシュプル構成内のトランジスタ対の中で、一方のトランジスタは常に活動状態にあり、他方のトランジスタは非活動状態にある。これは、いつでも半分のトランジスタが非活動状態にあることを意味する。しかしかかるトランジスタを回路から除くことはできない。なぜなら、電界が逆方向に与えられると、いくつかの対の活動状態のトランジスタが変わるからである。したがって、プッシュプル構成内のトランジスタ対に接続する電圧分割器ネットワークは効率がわるい。なぜなら、各電界で非活動状態のトランジスタの

50

総数がトランジスタの全数に比べて多過ぎるからである。

6. 全てのトランジスタ対は電流を制限する構成要素なしに電源に接続する。トランジスタが1個でも故障すると、電源の正出力と負出力とが短絡する。したがってこの回路は安全でない。

【0019】

CHEF装置の各電極に与える電圧の制御を改善するための演算増幅器の使用

他の一層複雑な装置は、室の6辺形配列の各電極に与える電位を個々に制御するために演算増幅器を用いる(米国特許第5,084,157号)。かかる装置は電界を与える2つの方向の間の角度を変えることはできるが、構造でも動作でも、装置の電子回路はますます複雑になる。また、電位を制御する構成要素と電力構成要素とを適切に絶縁することができない。デジタル変換が必要であるが、そのために複雑さが増し、設備のコストが高くなる。

10

【0020】

他方で、Riveron and cols.(キューバ特許、出願番号第2000-306号)は、P F G E内に再現可能な帯パターンを確実に得るには電気泳動室内の電界の強さを均一にすることが必要であることを示した。彼らは、与えた電界を均一にすることができるのは、閉じた外形内の電極に正しい極性を与えるための装置を有することの他に、緩衝剤とゲルの電気抵抗を均一にした場合だけであると結論した。電気抵抗は次のように表される。

$$R = (1 / \kappa) * (d / A)$$

ただし、 κ は電解液の導電率、 d は逆極性の電極の間の距離、 A は電流が流れる断面積である。

20

【0021】

全室内の電気抵抗を均一にするには、緩衝剤表面に乱流が存在しないことと、電流が流れる断面積を部分的にまたは全面的に変えるような変形もメニスカスもゲル内になく必要であると考えられる。

したがって、電極に極性を与えるための非常に複雑な電子回路を有していても、P F G E装置が緩衝剤の電気抵抗を均一にできない場合は確実な帯パターンと再現可能な実験を保証することはできない。室が小さい場合はこの状態は一層厳しくなる。

【課題を解決するための手段】

【0022】

(発明の詳細な説明)

本発明が提案する回路を適切に説明するには基準システムを定義する必要がある。

基準システム

(CHEF装置のP F G E室の)外形の閉じた電極として、正多角形の m 個の辺上に置いた複数の電極のグループを考える。ただし、 m は偶数である。この基準システム(図1)では L_1 辺を随意に定義して、デカルト平面の X 軸上に置く。対向辺($L_{(m/2)+1}$ と呼ぶ)は X 軸から距離 A のところにある。これにより、正多角形の残りの辺は L_1 辺と $L_{(m/2)+1}$ 辺の両側に対称的に分布する。 L_1 辺と $L_{(m/2)+1}$ 辺の左側にある正多角形の辺を C 辺と呼び、右側にある辺を D 辺と呼ぶ。

【0023】

各辺上に k 個の電極を置く。ただし、 k は1と10との間の自然数である。 X 軸上にある座標 $y_0 = 0$ の L_1 辺上に k 個の電極を置く。また X 軸から距離 A のところにある座標 $y_{n+1} = A$ の辺 $L_{(m/2)+1}$ 上にも k 個の電極を置く。

40

【0024】

C 辺と D 辺にある全ての電極を $E_{1C}, E_{2C}, \dots, E_{nC}$ と $E_{1D}, E_{2D}, \dots, E_{nD}$ と呼ぶ。ただし、 n は $k * (m - 2) / 2$ である。電極は、 C 辺と D 辺について、 L_1 辺から始まって $L_{(m/2)+1}$ 辺に達するまで、電極 $E_{1C}, E_{2C}, \dots, E_{nC}$ と電極 $E_{1D}, E_{2D}, \dots, E_{nD}$ のように名づける。2個の電極 E_{iC} と E_{iD} とは X 軸から同じ距離 y_i にある。ただし、 i は1と n との間の自然数である。($[E_{1C} - E_{1D}], [E_{2C} - E_{2D}], \dots, [E_{nC} - E_{nD}]$)を P_i 個の電極対と呼ぶ。

50

【 0 0 2 5 】

閉じた外形の電極内で電界を均一にする本発明の回路

回路を説明するため、まず前に説明した基準システムを用いて均一電界を作る方法について述べる。電気泳動中は、電源から得られる 0 ボルトと V_0 ボルトの所定の電圧で全ての電極を以下のように付勢すると仮定する。

- 1 . L_1 辺上に置いた k 電極に 0 ボルトを与える。
- 2 . 対向する $L_{(m/2)+1}$ 辺上に置いた k 個の電極に V_0 ボルトを与える。

【 0 0 2 6 】

しかし、 L_1 辺と $L_{(m/2)+1}$ 辺上に置いた電極に電位差を与えたとき、P F G E 室内の電界の強さは室の全ての場所で均一ではない。これは、 P_i 個の電極対内に、距離 y_i に比例しない電圧が現れることを意味する。したがって、電気泳動室内全体の電界が均一になるような電圧値を残りの電極に与えなければならない。すなわち、 P_i 個の電極対に電圧 $V_i = V_0 * y_i / A$ を与える。

【 0 0 2 7 】

これにより、閉じた外形の電極は決定された印加の方向に均一電界を生成するように極性が与えられる。同じ考え方が、大きさは同じだが力線の方向が他方の均一電界を生成するのも適用できる。必要なのは、正多角形の他方の辺を L_1 と定義することだけである。

【 0 0 2 8 】

本発明は、P F G E の両電界を 2 つの同一のクランピング回路で付勢することが可能であることを示す。かかるクランピング回路を、電界を交番させる既存の回路（すなわち交流機）の正出力と負出力との間に同時にはクランプ回路の 1 つだけが電気エネルギーを得るようにして接続する。

【 0 0 2 9 】

これらの各回路は電極内に、C H E F 装置室内の 1 つの印加方向に均一の強さの電界を生成する電圧を与える。電界を与える 2 方向の一方での回路接続は次の方法で行う。

- 1 . 交流機の負出力の 1 つを L_1 辺（X 軸上に置いた辺）上にある k 個の全ての電極にダイオードを介して接続する。交流機のこの負出力に対応する正出力を $L_{(m/2)+1}$ 辺にある k 個の電極（すなわち、X 軸から距離 A のところに置いた辺上にある電極）にダイオードを介して接続する。
- 2 . 交流機の負出力と L_1 辺の k 個の電極との間を、ダイオードを介して次のようにして接続する。
 - a) 正多角形の L_1 辺の各電極をダイオードのアノードに接続する。
 - b) かかるダイオード（電極毎に 1 つ）の全てのカソード同士を結合して第 2 のダイオードのアノードに接続する。
 - c) この第 2 のダイオードのカソードを交流機の負出力に接続する。

【 0 0 3 0 】

- 3 . 交流機の正出力と $L_{(m/2)+1}$ 辺の k 個の電極との間を、ダイオードを介して次のようにして接続する。
 - a) 正多角形の $L_{(m/2)+1}$ 辺の各電極をダイオードのカソードに接続する。
 - b) かかるダイオード（電極毎に 1 つ）の全てのアノード同士を結合して第 2 のダイオードのカソードに接続する。
 - c) この第 2 のダイオードのアノードを交流機の正出力に接続する。
- 4 . $n + 1$ 個の抵抗器 R_i と可変数のダイオードとで形成する電圧分割器の両端を、やはり交流機の負出力と正出力とに接続する。これにより、全電圧（ $V_0 - 0$ ）は、X 軸から各 P_i 電極対（ $E_{iC} - E_{iD}$ ）までの距離 y_i に比例する値に分割される。
- 5 . 電圧分割器の R_i 抵抗器と R_{i+1} 抵抗器との間に形成される各 N_i ノードを電圧リピータの入力に接続する。各電圧リピータの出力は P_i 個の電極対の 1 つに接続する。電圧リピータは 2 つの機能を有する。1 つは N_i ノードからの入力電圧をその出力（ P_i 電極対）に再現することである。もう 1 つの機能は、P F G E 中に緩衝剤の導電率の変化に抗

10

20

30

40

50

してこの電圧を一定に保持することである。

【0031】

電圧リピータには2種類ある。

1. i が $[(n/2) + 1]$ と n の間の自然数のときに分割器の N_i ノードと P_i 電極対との間に接続する電圧リピータ。この電圧リピータは次の回路構成要素で形成する。すなわち、

1個のNPN型トランジスタで、そのベースは電圧分割器の N_i ノードに接続し、そのコレクタは交流機の正出力に接続し、そのエミッタは2個のダイオードのアノードに接続し、各ダイオードのカソードは前に述べた P_i 電極対の電極に接続する。

2. i が1と $n/2$ との間の自然数のときに分割器の N_i ノードと P_i 電極対との間に接続する電圧リピータ。この電圧リピータは次の回路構成要素で形成する。すなわち、

1個のPNP型トランジスタで、そのベースは電圧分割器の N_i ノードに接続し、そのコレクタは交流機の負出力に接続し、そのエミッタは2個のダイオードのカソードに接続し、各ダイオードのアノードは前に述べた P_i 電極対の電極に接続する。

【0032】

各 R_i 抵抗器の値は、各 P_i 電極対の電圧が正多角形の L_i 辺上に置いた電極からの距離に比例するように選ぶ。

他の回路はこれと同一であるが、 E_i 個の電極に接続する方法が異なる。生成される電界の力線の間の望ましい角度に従って、多角形の別の辺を L_i 辺と再定義し、基準システムを必要な角度回転して、新しい L_i 辺が X 軸にあるようにする。C辺とD辺、 E_i 個の電極、 P_i 個の電極対を L_i 辺から始まって再定義する。

【0033】

これまでの考察から、各回路の P_i 個の電極対は異なると考えられる。このためにダイオードが必要であり、電極対を電圧リピータのトランジスタのエミッタに直接接続することはできない。電極対の2個の電極をダイオードにより結合することができるので、その電圧リピータが活動状態のときに両電極は同じ電位を有することができる。なぜなら、その方向に電界が与えられるからである。電界を他の方向に設定すると、昔の P_i 個の電極対を結合するダイオードは直列のままだが極性は逆である。これにより、この時点で異なる電位の電極を結合する昔の電極対の間の回路分岐の少なくとも1個のダイオードは逆極性が与えられる。回路分岐は非常に高い電気抵抗を有し、その分岐の電極は電氣的に絶縁される。

【0034】

緩衝剤の導電率の変化が分割器の各 N_i ノードの電位に与える影響は、電圧がそのノード電圧に等しくなるまでその電極に電流を流入または流出させることにより減少する。「エミッタ・フォロア」構成内のトランジスタが電流源として用いられる。負出力に近い方にある電極対は常に緩衝剤から電流を流出させなければならない。なぜなら、その電位は対応する基準ノードの電位より高くなる傾向があるからである。このため、この電流を電源の負出力の方に出すPNP型トランジスタを用いる。正出力に近い方にある電極対は常に緩衝剤に電流を流入させなければならない。なぜなら、その電位は対応するノードの電位より低くなる傾向があるからである。このため、電流を電源の正出力から取るNPN型トランジスタを用いる。このようにして、基準ノードの電位は余り影響を受けない。

【0035】

電気泳動中に緩衝剤の温度、濃度、pH、高さなどは変化する。かかる外乱は電極の電圧パターンを変えようとする。かかる影響を打ち消すのに必要な電流もトランジスタが管理する。

各電極対の電位はその基準電位に近いが、少し異なる。その差は電極対に関連するトランジスタのベース・エミッタとダイオードの電圧降下に起因する。この電圧降下はシリコン半導体構成要素のPN接合の特性であり、約0.7ボルトに近い。

【0036】

分割器の中心でトランジスタとダイオードの極性の変化が起こると電圧パターンに誤差

10

20

30

40

50

を生じる。この誤差は、電圧分割器の中心抵抗器に直列にダイオードを挿入することにより補償することができる。これにより基準ノードの電位は、各対のトランジスタとダイオード内の電圧降下の影響に対して大きさは同じだが逆方向に修正される。

【 0 0 3 7 】

最後に、 L_1 辺と $L_{(m/2)+1}$ 辺上において交流機の負出力と正出力とに接続する電極に極性を与えるダイオードに直列にダイオードを挿入する必要がある。これは、交流機の出力と各電極との間の経路内の電圧降下（正方向に極性を与えられた P N 接合により起こる）の数を均質化するのに必要である。かかる経路は C 辺と D 辺にある電極において 2 つの P N 接合を有する。

したがって本発明が提案する回路は、別の適当な電子回路を介して電源に接続して所望の強さとパルス幅で電界を交番させる 2 つの同一の部分から成る。

10

【 0 0 3 8 】

実施例

以下に回路の例を示すが、これは単なる例であって、決して本発明の範囲を制限するものではない。

【実施例 1】

【 0 0 3 9 】

例 1 : 18 個の電極を持つ 6 辺形の室の電極に極性を与える回路

電極の配列

図 2 に、各辺当たり 3 個の電極を持つ正 6 辺形上に置いた電極のグループ 1 0 1 から 1 1 8 を示す。電界を 1 つの方向（A と呼ぶ）に与えるときは、電極 1 0 1、1 0 2、1 0 3（A + グループと呼ぶ）に電源の正出力の電位に近い最大電位の極性を与える。電極 1 1 0、1 1 1、1 1 2（A - グループと呼ぶ）には 0 ボルトに近い最小電位の極性を与える。残りの電極は対に編成する（表 I）。同じ対の各電極には、各対から A - グループの電極までの距離に比例する同じ電圧の極性を与える。

20

【 0 0 4 0 】

電界を別の方向（B と呼ぶ）に与えるときは、電極 1 1 3、1 1 4、1 1 5（B + グループと呼ぶ）に電源の正出力の電位に近い最大電位の極性を与える。電極 1 0 4、1 0 5、1 0 6（B - グループと呼ぶ）には 0 ボルトに近い最小電位の極性を与える。残りの電極は対に編成する（表 I）。同じ対の各電極には、各対から B - グループの電極までの距離に比例する同じ電圧の極性を与える。

30

【 0 0 4 1 】

この特定の電極配列では、2 個の連続する電極の間の距離「d i s t」は同じである。しかし、電極対 1 1 8 - 1 0 4 と A + グループの電極との間の距離は半分、すなわち、d i s t / 2 である。1 1 3 - 1 0 9、1 1 6 - 1 1 2、1 0 3 - 1 0 7 の対と A -、B +、B - グループの電極とに関してもそれぞれ同じである。

【 0 0 4 2 】

【表 1】

表 I. 電極対と、接続する電圧リピータのトランジスタの型

A方向		B方向		トランジスタの型
118	104	116	112	NPN
117	105	117	111	
116	106	118	110	
115	107	101	109	PNP
114	108	102	108	
113	109	103	107	

10

20

各行は、図 1 と同様な電極配置を持つ室内で A と B の 2 つの印加方向に均一電界を生成するために同じ電圧の極性を与えなければならない電極の番号を示す。

【 0 0 4 3 】

辺当たり 3 個の電極を持つこの C H E F 室内に基準電位を生成するには直列に接続する 7 個の抵抗器 2 0 1 と 2 0 2 が必要である (図 3) 。抵抗器 2 0 1 の値は同じであり、抵抗器 2 0 2 はその半分の値を有する。抵抗器 2 0 1 および 2 0 2 のはしごは、スイッチまたは交流機を介して電源の正 (+) 出力と負 (-) 出力との間に接続する。この電圧分割器はノード 2 0 3 および 2 0 4 に現れる基準電位を生成する。

【 0 0 4 4 】

電圧リピータ 2 0 5 および 2 0 6 は基準ノード 2 0 3 および 2 0 4 から電圧を取り、A 方向と B 方向に該当する極性を電極に与える。

電圧リピータ 2 0 5 および 2 0 6 の詳細を図 4 に示す。N P N 型トランジスタ 3 0 1 のベースはノード 2 0 3 に接続する。トランジスタ 3 0 1 のコレクタはスイッチを介して正出力 (+) に接続する。トランジスタ 3 0 1 のエミッタは 2 個のダイオード 3 0 2 のアノードに接続する。ダイオード 3 0 2 のカソードは、その電位がその特定のノード 2 0 3 に対応する電極に接続する。

【 0 0 4 5 】

P N P 型トランジスタ 3 0 3 のベースはノード 2 0 4 に接続する。トランジスタ 3 0 3 のコレクタはスイッチを介して負出力 (-) に接続する。トランジスタ 3 0 3 のエミッタは 2 個のダイオード 3 0 4 のカソードに接続し、ダイオード 3 0 4 のアノードは、その電位がその特定のノード 2 0 4 に対応する電極に接続する。

【 0 0 4 6 】

表 1 は、N P N 型トランジスタ (電圧リピータ 2 0 4) と P N P 型トランジスタ (電圧リピータ 2 0 5) により極性を与えられる電極を示す。

A + グループと B + グループの電極 (図 5) はアノード同士を接続したダイオード 4 0 1 のカソードに接続する。ダイオード 4 0 1 のアノードは別のダイオード 4 0 2 のカソードに接続する。ダイオード 4 0 2 のアノードはスイッチを介して電源の正出力に接続する。

【 0 0 4 7 】

50

A - グループとB - グループの電極はカソード同士を接続したダイオード403のアノードに接続する。ダイオード403のカソードは別のダイオード404のアノードに接続する。ダイオード404のカソードはスイッチを介して電源の正出力に接続する。ダイオード402および404により、A + , A - , B + , B - グループの電極に極性を与える分岐は配列の残りの電極と同じ電圧降下 (PN接合により生じる) を持つことができる。

ダイオード207 (図3) はトランジスタとダイオードの極性変化により生じる電圧パターンの誤差を補償する。

【0048】

表IIは、理論電圧とCHEF室の電極内での測定電圧とを示す。電極は図2と同様に6辺形状の辺上に置いた。対向辺の間の距離は11.6cmであった。20 のとき、225mlの緩衝液TBE0.5x (TBE1x : トリス(Tris) 89mM、ホウ酸89mM、EDTA 2mM、pH 8.4) で室を満たした。電圧は前に説明した回路と同様の回路で生成した。用いた抵抗器は470.0オームで、抵抗器202の値を半分にするために2個のトランジスタを並列に置いた。MJE340およびMJE350トランジスタと1N4007ダイオードとを用いた。エネルギーは「マクロドライブI」電源から取り、A方向とB方向の正 (+) 出力と負 (-) 出力との間が一定電圧120.0ボルトになるように調整した。

10

【表2】

表II 理論値と、ここに示した回路が6辺形の辺上に18個の電極を持つCHEF室の電極内で生成した値

20

理論電圧 (ボルト)	実電圧(ボルト)			
	A方向		B方向	
118,6	101, 102 y 103: 118,7		115, 114 y 113: 118,7	
108,8	118: 108,8	104: 108,9	116: 108,8	112: 108,8
89,3	117: 89,2	105: 89,2	117: 89,2	111: 89,2
69,8	116: 69,7	106: 69,7	118: 69,7	110: 69,6
50,2	115: 50,2	107: 50,3	101: 50,4	109: 50,3
30,7	114: 30,8	108: 30,8	102: 30,8	108: 30,8
11,2	113: 11,2	109: 11,2	103: 11,2	107: 11,2
1,4	112, 111 y 110: 1,4		104, 105 y 106: 1,4	

30

図2に従う電極番号は太文字で示す。

【0049】

理論電圧は、シリコン半導体構成要素の各PN接合 (ダイオードとトランジスタのベース・エミッタとの) の代表的な電圧降下が0.7ボルトであることを考慮して計算した。計算では、トランジスタはベース電流がゼロの理想的な構成要素として考えた。

40

【実施例2】

【0050】

例2. 均一に分布していない36個の電極を持つ6辺形の室の点電極に極性を与える回路

図6は、各辺当たり6個の電極を持つ正6辺形上に置いた点電極のグループ501から536を示す。電界を1つの方向 (Aと呼ぶ) に与えるときは、電極501から506 (A+グループと呼ぶ) に電源の正出力の電位に近い最大電位の極性を与える。電極519から524 (A-グループと呼ぶ) には0ボルトに近い最小電位の極性を与える。残りの

50

電極は対に編成する（表 I I I）。同じ対の各電極には、各対から A - グループの電極までの距離に比例する同じ電圧の極性を与える。

【 0 0 5 1 】

電界を別の方向（B と呼ぶ）に与えるときは、電極 5 2 5 - 5 3 0（B + グループと呼ぶ）に電源の正出力の電位に近い最大電位の極性を与える。電極 5 0 7 - 5 1 2（B - グループと呼ぶ）には 0 ボルトに近い最小電位の極性を与える。残りの電極は対に編成する（表 I I I）。同じ対の各電極には、各対から B - グループの電極までの距離に比例する同じ電圧の極性を与える。

この場合、2 個の連続する電極の間の距離は同じではない。例えば、電極 5 0 1 と 5 0 2 との間の距離は、電極 5 0 2 と 5 0 3 との間の距離とは異なる。

10

【 0 0 5 2 】

辺当たり 6 個の電極を持つこの C H E F 室内の基準電位を生成するには直列に接続する 1 3 個の抵抗器 6 0 1, 6 0 2, 6 0 3 が必要である（図 7）。抵抗器 6 0 1, 6 0 2, 6 0 3 の抵抗値は、A 方向と B 方向毎に各電極の電位が各電極と A - および B - グループの電極との間の距離にそれぞれ比例するように選択しなければならない。この場合、抵抗器 6 0 1 は 3 4 8 オーム、抵抗器 6 0 2 は 4 7 0 オーム、抵抗器 6 0 3 は 2 3 5 オームである。抵抗器 6 0 1, 6 0 2, 6 0 3 の連鎖はスイッチを介して電源の正（+）電位と負（-）電位とに接続する。この電圧分割器はノード 6 0 4 および 6 0 5 に現れる基準電位を生成する。電圧リピータ 6 0 6 および 6 0 7 は基準ノード 6 0 4 および 6 0 5 から電圧を取り、A 方向と B 方向に該当する極性を電極に与える。電圧リピータ 6 0 6 および 6 0 7 は電圧リピータ 2 0 5 および 2 0 6（図 3）と同じものである。ダイオード 6 0 8 を抵抗器に直列に挿入し、電圧リピータ 6 0 6 および 6 0 7 内の活動状態のトランジスタの極性変化により生じる電圧パターンの誤差を訂正する。

20

【 0 0 5 3 】

A +, A -, B +, B - グループの電極に極性を与えるために、例 1 に示したものと同様の回路にダイオードを用いる（図 8）。この場合は、A + および A - グループの電極に極性を与えるのに 6 個のダイオード 7 0 1 および 7 0 3 を用いる。なぜなら、この特定の電極配列は各辺当たり 6 個のダイオードを持つからである。ダイオード 7 0 2 および 7 0 4 の機能は例 1 の場合と同様で、全ての電極の電位は同数の電圧降下により影響される。

【 0 0 5 4 】

30

【表 3】

表 III 理論値と、ここに示した回路が6辺形の辺上に置いた36個の電極を持つCHEF室の電極内で生成した値

理論電圧 (ボルト)	実電圧(ボルト)			
	A方向		B方向	
118,80	501,502,503,504,505,506:118,75	525,526,527,528,529,530:118,75		
113,18	536:113,15	507:113,15	524:113,15	531:113,15
104,85	535:104,70	508:104,70	523:104,75	532:104,75
93,62	534:93,40	509: 93,40	522:93,40	533: 93,40
85,28	533:85,05	510: 85,05	521:85,00	534: 85,00
74,05	532:73,90	511: 73,85	520:73,85	535: 73,85
65,72	531:65,65	512: 65,55	519:65,55	536: 65,65
54,48	530:54,40	513: 54,30	518:54,30	501: 54,40
46,15	529:46,15	514: 46,15	517:46,10	502: 46,10
34,92	528:34,90	515: 34,95	516:34,95	503: 34,95
26,58	527:26,60	516: 26,60	515:26,60	504: 26,55
15,35	526:15,35	517: 15,35	514:15,35	505: 15,35
7,02	525:6,95	518: 6,95	513:6,95	506: 6,95
1,4	524, 523, 522, 521, 520, 519: 1,4	512, 511, 510, 509, 508, 507:1,4		

各行は、AとBの2つの印加方向に均一電界を生成するために同じ電位の極性を与えなければならない電極の番号と電圧とを示す。第1列は各電極対に対応する理論電位を示す。図6に従う電極番号は太活字で示す。理論電圧は例1と同じ考え方で計算した。

【0055】

表IIIは、理論電圧とCHEF室の電極内で測定した電圧とを示す。電極は図6のような6辺形の辺上に置いた。対向辺の間の距離は11.6cmであった。20 のとき、225mlの緩衝液TBE0.5x(TBE1x:トリス89mM、ホウ酸89mM、EDTA2mM、pH8.4)で室を満たした。電圧は前に説明した回路と同様の回路で生成した。エネルギーは「マクロドライブI」電源から得た。その出力は、A方向とB方向の正(+)出力と負(-)出力との間が一定電圧120.2ボルトになるように調整した。

【0056】

上に示した例は、本発明の単なる例であってその範囲を制限するものではない。種々の大きさ、形、数、分布の電極を持つ室の電極に、ここに示した回路と同様の回路で極性を与えることができる。これは、回路構成要素(トランジスタ、ダイオード、抵抗器の数と抵抗器の抵抗値)を変えるだけで行うことが可能で、本発明の範囲に含まれる。

【0057】

(提案の利点)

- 1) 種々の形、大きさ、数、分布の電極を持つCHEF型の室の電極に正しい極性を与える。
- 2) 回路は従来技術の電圧クランピング装置より簡単であるが、電極内に生成される電圧パターンの精度は従来技術の装置により生成されるものと同様以上である。

10

20

30

40

50

- 3) 用いる電源の正出力と負出力との短絡は起こり得ない。
- 4) 同じ理論的等電位線内にある電極対を等しく極性化することができる。
- 5) 電界を2方向に生成する回路は独立である。
- 6) 用いるトランジスタの数は従来技術の装置より少なくとも3倍少ない。
- 7) 回路は低コストで、修理や保全が容易である。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】本発明の回路により極性を与えることが可能なCHEF装置のPFGE室内の電極の分布を説明するのに用いる基準システムを示す図。電極は m 辺の正多角形上に置かれる。ただし、 m は4と50との間の偶数である。 k 個の電極を多角形の各辺上に置く。ただし、 k は1と10との間の自然数である。多角形の一辺(L_1 と呼ぶ)をデカルト平面の X 軸と一致させる。多角形の対向辺($L_{(m/2)+1}$ と呼ぶ)は X 軸から $y = A$ の距離にある。 L_1 辺と $L_{(m/2)+1}$ 辺の左側は C 辺、右側は D 辺である。

10

【図2】6辺形のCHEF室に含まれる18個の電極の分布の略図。シンボル $A+$ および $A-$ は、電界をその方向に作る電源の正出力と負出力とに接続する(交流機回路を介して)電極を示す。シンボル $B+$ および $B-$ は、電界を B 方向に作る電源の正出力と負出力とに接続する(交流機回路を介して)電極を示す。

【図3】電源出力に接続する(交流機回路を介して)ダイオードと抵抗器とで形成する電圧分割器を示す図。この回路は18個の電極を持つ6辺形のCHEF室の電極の一部に極性を与える電圧を生成する。電圧リピータは抵抗器の間に形成されるノードに接続する。

20

【図4】電圧リピータを示す図。トランジスタのベースは電圧分割器のノードに接続し、エミッタは2個のダイオードに接続し、ダイオードは同じ電位の極性を与えるべき1対の電極に接続する。上側に示すのはNPNトランジスタを持つ電圧リピータで、NPNトランジスタのコレクタは電源の正出力に接続する(交流機回路を介して)。下側に示すのはPNPトランジスタを持つ電圧リピータで、PNPトランジスタのコレクタは電源の負出力に接続する(交流機回路を介して)。

【図5】左側は18個の電極を持つ6辺形モデルのCHEF室内の $A+$ または $B+$ グループの電極に極性を与える回路を示す図。上部のダイオードのアノードはスイッチを介して電源の正出力に接続する。右側は18個の電極を持つ6辺形モデルのCHEF室内の $A-$ または $B-$ グループの電極に極性を与える回路を示す図。下部のダイオードのカソードはスイッチを介して電源の負出力に接続する。

30

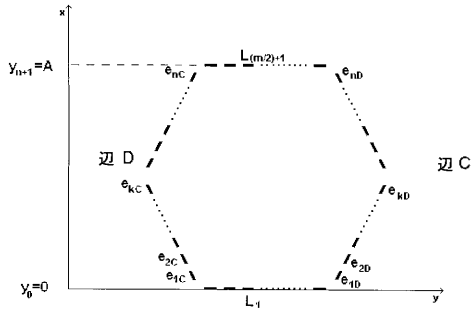
【図6】6辺形のCHEF室に含まれる36個の電極の分布の略図。シンボル $A+$ および $A-$ は、電界をその方向に作る電源の正出力と負出力とに接続する(交流機回路を介して)電極を示す。シンボル $B+$ および $B-$ は、電界を B 方向に作る電源の正出力と負出力とに接続する(交流機回路を介して)電極を示す。

【図7】電源出力に接続する(交流機回路を介して)ダイオードと抵抗器とで形成する電圧分割器を示す図。この回路は36個の電極を持つ6辺形のCHEF室の電極の一部に極性を与える電圧を生成する。電圧リピータは抵抗器の間に形成されるノードに接続する。

【図8】上側は36個の電極を持つ6辺形モデルのCHEF室内の $A+$ または $B+$ グループの電極に極性を与える回路を示す図。回路の上部のダイオードのアノードはスイッチを介して電源の正出力に接続する。下側は36個の電極を持つ6辺形モデルのCHEF室内の $A-$ または $B-$ グループの電極に極性を与える回路を示す図。回路の下部のダイオードのカソードはスイッチを介して電源の負出力に接続する。

40

【 図 1 】



【 図 2 】

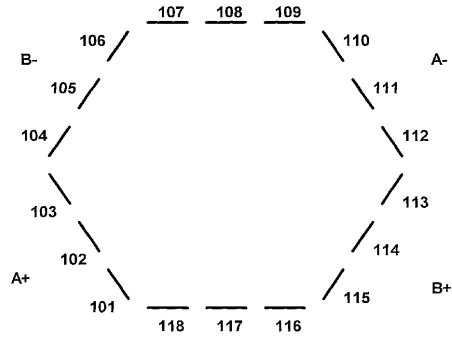


Fig. 2

【 図 3 】

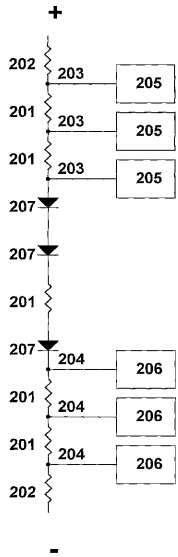


Fig. 3

【 図 4 】

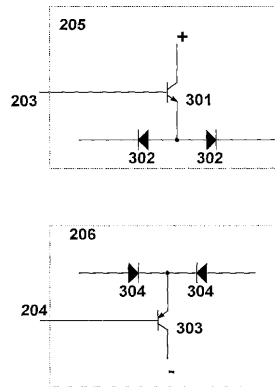


Fig. 4

フロントページの続き

- (72)発明者 ヘレラ イシドロ、ホセ、アルフレド
キューバ国、シウダド ハバナ、プラヤ、 レパルト フロレス、カレ 174、 エディフィシ
オ ビービーイー - 2、アバルタミエント 14
- (72)発明者 リヴェロン ロヤス、アナ、マリア
キューバ国、シウダド ハバナ、プラヤ、アタベイ、 カレ 21エイ ナンバー 20614
エントレ 206エイ イ 214
- (72)発明者 カニーノ ラモス、カルロス、アルベルト
キューバ国、シウダド ハバナ、ボイエロス、マリア デル カルメン、 カレ 192 ナンバ
ー 1991 エントレ 199 イ 201
- (72)発明者 ロベス カノヴァス、リリア
キューバ国、シウダド ハバナ、プラヤ、アタベイ、 カレ 21エイ ナンバー 20614
エントレ 206エイ イ 214
- (72)発明者 ノア ブランコ、マリア、ドロレス
キューバ国、シウダド ハバナ、プラヤ、 カレ 10 ナンバー 125 エントレ 1アール
エイ イ 5ティーエイ

審査官 郡山 順

- (56)参考文献 特開平02-114169(JP,A)
特開平02-028550(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 27/447